

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

\_\_\_\_\_ Т.Г. Волова

«22» июня 2021 г.

**МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ**

Синтез основных и запасных внутриклеточных макромолекул бактериями

*Cupriavidus necator* В-10646

06.04.01 Биология

06.04.01.01 Микробиология и биотехнология

Руководитель	_____	<u>Профессор, д.б.н.</u>	Т. Г. Волова
	подпись, дата	должность, ученая степень	
Студент	_____	<u>ББ19 – 01М, 041942692</u>	Е. К. Егорова
	подпись, дата	группа, номер зачётной книжки	
Рецензент	_____	<u>С.н.с., к.б.н.</u>	А. Н. Бояндин
	подпись, дата	должность, ученая степень	

Красноярск 2021

## РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация на тему «Синтез основных и запасных внутриклеточных макромолекул бактериями *Cupriavidus necator* В-10646» содержит 61 страницу текстового документа, 81 использованный источник литературы, 4 таблицы и 4 иллюстрации.

Ключевые слова: *Cupriavidus necator*, одноклеточный белок, аминокислотный состав, фракционный состав, полигидроксиалканоаты.

Актуальность выбранного исследования обусловлена существующим дефицитом белка в рационе человека. Продовольственная проблема с недостатком биологически полноценных продуктов не только не теряет своей остроты со временем, но и становится одной из самых актуальных. Эффективность решения этой проблемы определяется использованием новых методов производства продуктов питания и привлечением новых источников сбалансированного пищевого белка, одним из которых является белок микроорганизмов.

Целью настоящего исследования стало определение биологической ценности белков и соотношение белок/полимер в биомассе водородокисляющих бактерий *Cupriavidus necator* В-10646. Для достижения поставленной цели реализовывались следующие задачи:

1. Изучить влияние различных концентраций хлорида аммония на накопление биомассы, синтез белка и полимера бактериями *C. necator* В-10646;
2. Изучить биохимический состав водородокисляющих бактерий *C. necator* В-10646 и соотношение в ней белок/полимер;
3. Определить аминокислотный состав белков бактерий и биологическую ценность их суммарного белка на основании вычисления аминокислотного сора;
4. Исследовать фракционный состав белков бактерий.

В результате проведенных исследований определено влияние различных концентраций хлорида аммония в культуре *Cupriavidus necator* В-10646 на

накопление биомассы, содержание в ней белка и полимера. Показано, что урожай биомассы и соотношение в ней запасных (полимера) и основных (белка) макромолекул зависят от концентрации  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

При рассмотрении биохимического состава биомассы, синтезированной бактериями на полной питательной среде, определено, что она в основном содержит азотсодержащие компоненты (белки) и в незначительных количествах углеводы и липиды.

Исследование показало, что белки водородокисляющих бактерий имеют преимущество перед белками растительного происхождения по степени биологической ценности продукта. Высокий уровень содержания общего белка в биомассе и полное содержание в них аминокислот позволяют рассматривать эти микроорганизмы как потенциальные продуценты белка.

## СОДЕРЖАНИЕ

РЕФЕРАТ	2
СОДЕРЖАНИЕ	4
ВВЕДЕНИЕ	6
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
1.1 Одноклеточные организмы как потенциальные источники белка	9
1.2 Особенности химического состава микроорганизмов как возможных источников пищевого белка	16
1.3 Биологическая ценность белков и определяющие ее факторы	21
1.4 Биопродукты из водородокисляющих бактерий	28
1.5 Влияние концентрации источника азота на рост микроорганизмов и синтез полимера	30
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	34
2.1 Объект исследования	34
2.2 Культивирование бактерий	35
2.3 Определение сухой биомассы клеток	36
2.4 Определение содержания и состава ПГА в клетках бактерий	36
2.5 Изучение биохимического состава биомассы бактерий	36
2.6 Определение аминокислотного состава белка биомассы бактерий	37
2.6.1 Подготовка исследуемого материала к проведению общего аминокислотного анализа	38
2.6.2 Анализ серосодержащих аминокислот	38
2.6.3 Определение триптофана	39
2.7 Фракционирование клеточных белков в системе растворителей возрастающей ионной силы и рН	40
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ	42
3.1 Исследование влияние концентрации азота на накопление биомассы и полимера	42
3.2 Биохимический состав биомассы водородокисляющих бактерий	43

3.3	Аминокислотный состав как характеристика биологической ценности белков одноклеточных организмов	44
3.4	Исследование фракционного состава клеточных белков водородокисляющих бактерий	47
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	51
	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	53

## ВВЕДЕНИЕ

Белок считается самым дефицитным компонентом питания человека, и мировая потребность в белке на сегодняшний день удовлетворяется не в полном объеме. Это происходит из-за того, что Земля обладает ограниченными ресурсами, а существующие сельскохозяйственные технологии экстенсивны, поэтому не способны обеспечить принципиального прорыва в обеспечении населения белковыми продуктами. Поэтому поиск действенных методик наращивания ресурсов белковых веществ является одной из ведущих задач научно-технического прогресса.

В настоящее время обостряется проблема обеспечения белковыми продуктами населения развивающихся стран. Вследствие этого, актуальным направлением является поиск новых перспективных сбалансированных источников пищевого белка, таких как микробный белок.

Микроорганизмы могут являться источниками для получения целевых продуктов пищевого, технического и медицинского назначения. Процесс микробного роста - это синтез первичных метаболитов и их сборка в основные макромолекулы. Продукты обмена запасной природы накапливаются при несбалансированном росте из-за истощения какого-либо компонента питания в среде и ограничения роста и синтеза основных (азотсодержащих) клеточных компонентов. Лимитирование роста микроорганизмов приводит к замедлению скорости роста клеток, изменению химического состава, особенно, соотношению основных и запасных макромолекул.

Наиболее ценными чертами микроорганизмов являются высокое содержание белка и способность быстро расти на разнообразных органических и минеральных субстратах. Микробиологическое производство, по сравнению с сельским хозяйством, не нуждается в больших земельных площадях, не зависит от погодных условий и эффективнее потребляет энергетические и сырьевые ресурсы.

Перспектива использования водородокисляющих бактерий в качестве продуцентов белка по сравнению с другими исследуемыми объектами предопределяется их способностью к автотрофии, высоким содержанием полноценного по аминокислотному составу белка (до 60-70%), отсутствием внеклеточных промежуточных продуктов обмена органической природы, экологической чистотой производства и качеством конечного продукта, а также способностью роста на водороде.

Белок одноклеточных активно изучается во всем мире как один из перспективных пищевых продуктов в силу высокой питательности и простоты получения. В качестве источников получения белка исследуются различные одноклеточные микроорганизмы и разнообразные субстраты.

Ценным продуктом биотехнологии являются запасные соединения липидной природы - полимеры гидроксипроизводных жирных кислот, характеризующиеся биосовместимостью и биоразрушаемостью, и имеющие перспективы для различных сфер применения.

Грамотрицательные факультативные хемолитотрофные бактерии *Cupriavidus necator* В-10646 могут продуцировать полигидроксиалканоаты (ПГА), способны синтезировать полимеры с большим выходом (до 80-90%) и различной химической структурой на широком спектре субстратов. Для накопления бактериями ПГА необходимо производить процесс культивирования в определенном режиме. Для этого необходимо поддерживать определенное соотношение источника углерода и азота.

Цель работы – определить биологическую ценность белков и соотношение белок/полимер в биомассе водородокисляющих бактерий *Cupriavidus necator* В-10646.

Для достижения цели были поставлены задачи:

1. Изучить влияние различных концентраций хлорида аммония на рост и синтез биомассы бактериями *C. necator* В-10646
2. Изучить биохимический состав водородокисляющих бактерий *C. necator* В -10646 и соотношение в ней белок/полимер;

3. Определить аминокислотный состав белков бактерий и биологическую ценность их суммарного белка на основании вычисления аминокислотного сора;

4. Исследовать фракционный состав белков бактерий.



# 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1 Одноклеточные организмы как потенциальные источники белка

Особенности культивирования, физиологические и биохимические свойства некоторых одноклеточных организмов в настоящее время интенсивно исследуются в связи с задачами промышленного производства кормового и пищевого белка [1-2].

В литературе обсуждается ряд потенциальных преимуществ одноклеточных микроорганизмов, как белковых продуцентов, по сравнению с другими организмами. К этим преимуществам относятся следующие:

1. Микробиологический синтез позволяет осуществлять производство пищевого и кормового белка в промышленных масштабах. Культивирование одноклеточных организмов в компактных установках, в строго контролируемых и регулируемых условиях, с высокой производительностью и эффективностью превращения исходного сырья и энергии, ставит производство белка вне зависимости от погодных и климатических условий, дает возможность планировать выпуск продукции.

2. По скорости синтеза белка одноклеточные организмы не имеют себе равных в мире живых существ. Время удвоения их биомассы может исчисляться несколькими часами.

3. Одноклеточные организмы могут утилизировать самые разнообразные органические соединения, в том числе отходы промышленных производств. Кроме того, они способны к автотрофному росту и утилизации исходного источника углерода –  $\text{CO}_2$ .

4. Большинство одноклеточных организмов отличается высоким содержанием белка.

5. Возможна направленная селекция штаммов с заранее заданными свойствами [3, 4].

С точки зрения практического использования культуры одноклеточных организмов как источника белка является желательным неограниченно долго

поддерживать состояние экспоненциального роста клеток при постоянной концентрации субстрата и неизменных прочих условиях. Этой цели можно добиться с помощью метода непрерывного культивирования, основанного на постоянном обновлении питательной среды и отборе из культиватора соответствующих количеств синтезированной биомассы.

Важнейшей отличительной особенностью непрерывной культуры по сравнению с периодической является то, что она в большей степени управляема и позволяет осуществлять автоматическое регулирование. Широкое варьирование параметрами культивирования и их стабилизация на желаемом уровне создает уникальную возможность исследования зависимости физиологических, биохимических и других свойств клеток от условий среды [5].

Использование интенсивных культур одноклеточных организмов позволяет получать достаточно высокие урожаи клеток для проведения экспериментов по изучению их пищевой и кормовой ценности и, в первую очередь, химического состава выращенной биомассы.

В качестве продуцента белковых веществ активно исследуются различные одноклеточные микроорганизмы. Разные виды водорослей [6, 7], грибов [3, 4], дрожжей [8, 9] и бактерий [10-13], используемые в качестве белка одноклеточных, производятся в промышленных масштабах (таблица 1). Эти организмы, выращиваются на различных источниках углерода [3, 9, 11].

Таблица 1– Микроорганизмы и субстраты, используемые для производства белка одноклеточных [13]

Микроорганизмы	Субстраты
<b>Бактерии</b>	
<i>Aeromonas hydrophyla</i>	Лактоза
<i>Acromobacter delvavate</i>	н-алканы
<i>Acinetobacter calcoaconticus</i>	Этанол
<i>Bacillus megaterium</i>	Небелковые азотистые соединения
<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Cellulomonas sp.</i> , <i>Flavobacterium sp.</i> , <i>Thermomonospora fusca</i>	Целлюлоза, гемицеллюлоза
<i>Lactobacillus sp.</i>	Глюкоза, амилоза, мальтоза
<i>Methylomonas methylotrophus</i> , <i>M. clara</i>	Метанол
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Мочевая кислота и др. небелковые азотистые соединения
<i>Rhodopseudomonas capsulata</i>	Глюкоза
<b>Грибы</b>	
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Мальтоза, глюкоза
<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus oryzae</i>	Целлюлоза, гемицеллюлоза
<i>Penecillium cyclopium</i>	Глюкоза, лактоза, галактоза
<i>Rhizopus chinensis</i>	Глюкоза, мальтоза
<i>Thricoderma viridae</i> , <i>T. alba</i>	Глюкоза, пентоза
<b>Дрожжи</b>	
<i>Amoco torula</i>	Этанол
<i>Candida tropicalis</i>	Мальтоза, глюкоза
<i>Candida utilis</i>	Глюкоза
<i>Candida novellas</i>	н-алканы
<i>Candida intermedia</i>	Лактоза
<i>Saccharomyces cereviciae</i>	Лактоза, пентоза, мальтоза
<b>Водоросли</b>	
<i>Chlorella pyrenoidosa</i> , <i>Ch. sorociana</i> , <i>Chondrus crispus</i> , <i>Scenedesmus sp.</i> , <i>Spirulina sp.</i> , <i>Porphyrium sp.</i>	Диоксид углерода в процессе фотосинтеза

Субстратами, использующимися для производства белка дрожжами, до сих пор являются гидролизаты сорго, сульфатные спиртовые отходы, молочные отходы, метанол, патока, крахмал и жидкие отходы растительного происхождения [8, 9]. Доступность сырья является одним из важнейших

критериев в биотехнологии и определяет целесообразность и экономику процесса [5].

Широкое использование приобрели дрожжи рода *Candida*, утилизирующие пентозы вместе с гексозами и устойчивые к наличию фурфурола в среде. Переработка углеродсодержащих компонентов субстрата проходит поочередно: глюкоза, уксусная кислота, манноза, ксилоза, галактоза, арабиноза. Полнота использования компонентов зависит от культивирования; максимальная – в смешанных культурах [5].

Одним из источников сырья являются возобновляемые ресурсы углеводов, получаемые из лигниноцеллюлозных материалов. Для осахаривания их обрабатывают классическими методами, например, на основе целлюлолитических ферментов или микробных клеток. Во время роста микробные клетки разлагают целлюлозу и насыщают получаемый продукт аминокислотами [14, 15].

В проведении исследований по изысканию новых источников сырья для микробиологического синтеза целевых продуктов, в том числе белка, прослеживаются две тенденции: ориентация на «чистые» виды сырья и на переработку комплексных соединений, включая отходы производств. Использование чистого сырья позволяет создавать масштабные производства продукта постоянного качества. Использование отходов выгодно экономически и значимо для охраны природы. Перспективность сырьевого источника определяется сферой применения продукта и требованием к качеству [5, 16].

В роли многообещающих видов сырья для многотоннажного получения микробного белка выделяют водород, спирты и природный газ. Самыми перспективными субстратами считаются этанол и метанол [3, 13, 17].

Доказано, что усваивать метанол могут и дрожжи (*Hansenula*, *Candida*), и бактерии (*Pseudomonas*, *Methylomonas*) [8, 9]. В отличие от жидких углеводов, метанол обладает высокой летучестью, чистотой, растворимостью в воде и не содержит канцерогенных примесей.

Считается, что белок, синтезируемый *Scytalidium acidophilum* существенно отличается от белка, производимого *Candida utilis* [8]. *Kluveromyces marxianus* имеет фермент, который может использоваться для модификации сыворотки при производстве белка одноклеточных [2].

Качество белка одноклеточных является важным фактором для промышленного производства. Точным методом для оценки качества белка является определение коэффициента эффективности белка (КЭБ), выраженного в единицах веса тестируемого животного на единицу белка, потребляемого им в испытательных пробах. Одним из параметров, определяющих качество белка, является коэффициент переваримости белка протеолитическими ферментами. И, таким образом, полная белковая утилизация эквивалентна расчету биологической ценности, умноженной на коэффициент перевариваемости - это мера усвояемости белков и биологическая ценность аминокислот, всасываемых из пищи [18].

Белок одноклеточных, как правило, оценивается в единицах Кьельдаля азот  $\times 6,25$  (стандартный фактор, имеющий отношение аминного азота к содержанию белка). Тем не менее, около 10-15% от общего содержания азота в грибах и дрожжах содержатся в виде нуклеиновых кислот [1, 6].

Типы применяемых режимов ферментации и аппаратуры зависят от физиологической специфики штамма-продуцента. С точки зрения практического использования культуры одноклеточных организмов, как источника белка, представляется желательным неограниченно долго поддерживать состояние экспоненциального роста клеток при постоянной концентрации субстрата и неизменных прочих условиях. Этой цели добиться можно с помощью метода непрерывного культивирования, основанного на постоянном обновлении питательной среды и отбора из культиватора соответствующих количеств синтезированной биомассы. Теории и практике непрерывного культивирования уделяется значительное внимание исследователей в связи с разработкой промышленной технологии синтеза пищевого белка [5].

Важнейшей отличительной особенностью непрерывной культуры, по сравнению с периодической, является то, что она в большей степени управляема, позволяет осуществить автоматическое регулирование. Широкое варьирование параметрами культивирования и их стабилизация на желаемом уровне создает уникальную возможность исследования зависимости физиологических, биохимических и других свойств клеток от условий среды [5].

В условиях непрерывного культивирования получены максимальные скорости роста одноклеточных организмов и высокие урожаи биомассы (до 30-40 г сухой хлореллы (*C. vulgaris*) и до 500 г сухих дрожжей с 1 л культуры в сутки). Применение непрерывного метода позволяет в отдельных случаях осуществлять массовое культивирование одноклеточных организмов в нестерильных условиях, что является весьма важным. Так, например, установлено, что при нестерильном культивировании хлореллы на протоке с гетеротрофными организмами в альго-бактериальном сообществе обычно составляют около 1,6 – 4,8% [7].

Использование интенсивных культур одноклеточных организмов позволяет получать достаточно высокие урожаи клеток для проведения экспериментов по изучению пищевой и кормовой ценности и, в первую очередь, химического состава выращенной биомассы [4].

Культивирование дрожжей (*C. boidinii*, *H. polymorpha*) в условиях асептической ферментации проходит на ферментерах с вводом энергии жидкой фазы. Выход биомассы доходит до 75 т в сутки при концентрации клеток 30 г/л. Затраты метанола – 2,5 т/т. Состав получаемых дрожжей (%): «сырой» протеин – 56-62, липиды – 5-6, нуклеиновые кислоты – 5-6 [9].

Для ферментации бактерий (*Methylomonas clara*, *Ps. rosea*) на метаноле используют струйные аппараты производительностью 100-300 т биомассы в сутки. Бактериальная биомасса превосходит дрожжевую по азотсодержащим компонентам (%): «сырого» протеина – до 74, нуклеиновых кислот – 10-13 [1].

Некоторые штаммы дрожжей (*C. utilis*, *Hansenula anomala*) способны получать продукты с содержанием белка до 60%, используя в качестве субстрата этанол [5].

Газообразные углеводороды, особенно метан, содержащийся в природном газе, считаются доступным сырьем для производства микробного белка. Природный газ обладает низкой стоимостью и доступностью, не содержит ингибирующих рост микроорганизмов примесей, дает возможность получать большие выходы биомассы и не нуждается в очистке сырья и биомассы [5].

Некоторые бактерии (*Pseudomonas*, *Methanomonas*) утилизируют метан в качестве источника углерода и энергии. Синтез биомассы проходит с выделением в околочлеточную среду промежуточных продуктов окисления метана, ингибирующих рост бактерии. Этого можно избежать, используя микробную ассоциацию с гетеротрофными видами, утилизирующих продукты окисления [1, 5].

Перспективными продуцентами белка могут стать хемолитотрофные микроорганизмы и, в первую очередь, водородокисляющие бактерии. Интерес к водородным бактериям определяется их автотрофией, в этом случае синтез биомассы не зависит от источников органического сырья. Это открывает перспективы для превращения электро-, атомной и солнечной энергии в белок через электролитическое, тепловое или фотохимическое разложение воды [5, 19].

В настоящее время вследствие ограниченности объемов производства электролизного водорода и высоких тарифов на электроэнергию данный субстрат по сравнению с природным газом считается менее подходящим для формирования многотоннажного производства кормового белка. Однако, учитывая усиленное развитие водородной энергетики, этот вид микробиологического синтеза, не зависящий от ресурсов органического сырья и не загрязняющий окружающую среду побочными продуктами и отходами, несомненно, представляется перспективным.

Темпы прироста народонаселения, существенно опережающие

наращивание объемов сельскохозяйственной продукции, увеличивают существующий дефицит пищи, в особенности, ее белковой составляющей. Поэтому поиск принципиально новых и эффективных методов увеличения источников белковых веществ считается одной из главных задач научного прогресса [5].

В последнее время активировались исследования, связанные с синтезом белка одноклеточных, так как это один из наиболее перспективных источников питания, в силу высокой питательной ценности и простоты получения [20]. Рассматриваются различные микроорганизмы и субстраты: бактерии *Cellulomonas biazotea*, культивируемые на обработанных гидролизатах травы *Leptochloa fusca* [12], ассоциация *Methylococcus capsulatus* – на метане [1]; дрожжи *Candida lutzeri* – на гидролизате жмыха сахарного тростника [9]; *Debaryomyces hansenii* – на солодовых отходах пивоварения [21, 22].

## **1.2 Особенности химического состава микроорганизмов как возможных источников пищевого белка**

По общему химическому составу одноклеточные организмы очень сходны с другими клетками животного и растительного происхождения [23-28]. В клетках микроорганизмов присутствуют все основные классы химических соединений, характерные для живой материи – белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды и липиды. Кроме основных компонентов одноклеточные организмы содержат комплексы – гликопротеиды, липопротеиды и гликолипопротеиды. Липополисахариды (ЛПС) являются довольно специфическим типом клеточных компонентов, характерных для грамотрицательных бактерий и синезеленых водорослей. Компоненты, характерные для микроорганизмов, обычно, входят в состав их клеточных стенок, например, пептидогликаны (мукопептиды, муреин) и тейхоевые кислоты [29].



Вопросы, относящиеся к возможности переваривания микробных клеточных структур, их пищевая ценность и безвредность для организма человека и животных остаются важными вопросами и требующими изучения. Исследования структуры клеточных стенок показали, что у грамположительных видов бактерий она имеет пептидогликановую природу, толстая и аморфная. Клеточная стенка грамотрицательных микробов состоит из муреина, из которого построен ригидный мукопептидный слой (составляет 0,1–10% сухого веса клетки) липофильного липополисахаридного комплекса (1-5% сухого веса клетки), фосфолипидов (5-15% сухого веса клетки) и белка [29, 30].

В составе клеточных стенок некоторых водорослей и бактерий обнаружены аminosахара. Например, среди представителей рода *Chlorella* у *Chl. pyrenoidosa* обнаружен глюкозамин, а у *Chl. vulgaris* и *Chl. ellipsoidea* – глюкозамин и галактозамин. У водоросли *Platimonas subcordiformis* присутствие аminosахаров не наблюдается [6]. Аminosахара часто являются компонентами липополисахаридов клеточных стенок синезеленых водорослей и грамотрицательных бактерий [13].

Полисахариды и липополисахариды бактерий и некоторых цианобактерий содержат ряд «уникальных» аminosахаров, не найденных в настоящее время в углеводах животного и растительного происхождения. Среди них, в первую очередь, необходимо отметить мурамовую кислоту, являющуюся в бактериальных клеточных стенках связующим компонентом гликанового остова стенки и пептидов, а также фукозамин, виозамин и некоторые диаминосахара [29].

Предпосылкой широкого использования биомассы непатогенных бактерий и некоторых водорослей в целях получения ресурсов пищевого белка является высокое содержание белка в большинстве из них. Так называемый «сырой протеин», рассчитываемый умножением определяемого в биомассе «общего» азота на пересчетный коэффициент 6,25, обычно, колеблется у одноклеточных организмов от 40 до 80% веса сухой клеточной биомассы и зависит от вида организмов и условий роста [8].

Исследование аминокислотного состава клеточных гидролизатов показало, что основным компонентом азотистых веществ одноклеточных организмов является белок (до 70-80%) [31, 32]. Белки этих организмов состоят из тех же аминокислот, которые найдены в белках животного и растительного происхождения [33-36]. Однако аминокислотный состав водорослей, бактерий и дрожжей, как правило, дефицитен по серосодержащим аминокислотам, хотя среди незаменимых аминокислот есть, иногда, и другие, такие как триптофан, лизин, изолейцин, лимитирующие биологическую ценность белков одноклеточных организмов [37-39].

В составе клеточных стенок водорослей и бактерий обнаружены «необычные» аминокислоты – такие как диаминопимелиновая кислота, орнитин,  $\gamma$ -аминомасляная кислота, D-изомеры аминокислот. Необходимо отметить, что по данным некоторых авторов до 10-20% аминокислотного пула бактерий может быть представлено D-формами [31].

Одноклеточные организмы содержат большое количество нуклеиновых кислот, у некоторых бактерий и дрожжей более чем 10% веса сухой биомассы [39].

К необычным липидам, встречающимся у бактерий, относится «резервный полимер» - поли- $\beta$ -оксимасляная кислота и липид А, содержащийся в липополисахаридном слое грамотрицательных бактерий [5, 40, 41].

В состав растворимого фонда клетки наряду с химическими компонентами важнейших макромолекул входят низкомолекулярные соединения (полиамины, витамины, нуклеотиды, минеральные вещества, аминокислоты и др.). Что касается фонда свободных аминокислот клеток микроорганизмов, то он исследован недостаточно. Наряду с обычными аминокислотами и амидами дикарбоновых кислот у некоторых бактерий в составе фонда свободных аминокислот идентифицированы цитруллин,  $\gamma$ -аминомасляная кислота, таурин, орнитин, цистотеновая и цистотионеновая кислоты [13]. На основе исследования микроорганизмов, культивируемых в

различных условиях, выдвинуто несколько основных положений об аминокислотном составе пула:

- в нем преобладающими являются глутаминовая и аспарагиновая кислоты, аланин, реже аргинин и гистидин; при истощении пула под действием различных факторов, прежде всего, уменьшается количество глутаминовой кислоты, иногда глутамина,  $\gamma$ -аминомасляной кислоты и аргинина;
- качественно состав пула не отличается от состава аминокислот гидролизатов белков;
- наблюдается определенная вариабельность качественного и количественного состава от фазы роста и условий культивирования [3]. При старении культуры клеток содержание в них свободных аминокислот снижается [13].

Фонд свободных аминокислот клетки поддерживается в результате непрерывных процессов распада клеточных белков и нового синтеза белков, биологически активных пептидов, аминов, аминокислот и некоторых других продуктов обмена веществ, например, некоторых антибиотиков [3].

Исследования растворимого фонда одноклеточных организмов интересны в связи с данными о токсичности некоторых представителей синезеленых водорослей. Установлена природа некоторых веществ низкой молекулярной массы из синезеленых водорослей, токсичность которых доказана. Установлена принадлежность токсинов к разным классам химических соединений. Например, анатоксин А, выделенный из *Anabena flosaquae*, является алкалоидом. Эндотоксин из водорослей *Microcystis aeruginosa*, названный микроцистином, представляет собой полипептид (до 16 аминокислот) небольшой молекулярной массы (1300-2600 Да). В его состав входят ряд аминокислот L-конфигурации и D-формы серина [13].

Полученные данные по токсичности некоторых видов одноклеточных организмов не должны стать сдерживающим фактором их дальнейшего изучения как потенциальных источников пищевых и кормовых препаратов, т.к. токсичность биомассы одноклеточных организмов в некоторых случаях

удавалось устранить соответствующей предварительной обработкой клеток [42].

Биохимический состав биомассы одноклеточных организмов может изменяться благодаря пластичности их метаболизма, поддающегося приемам селекции и влиянию условий культивирования [43]. Так, в течение цикла развития водородокисляющих бактерий меняется внутриклеточное содержание белков, нуклеиновых кислот, запасного энергетического вещества – полимера  $\beta$ -оксималяной кислоты. Максимальное количество белков клетки накапливается в экспоненциальной фазе роста, а полимер  $\beta$ -оксималяной кислоты синтезируется в условиях стационарной фазы. При азотном и кислородном голодании, а также при наличии избытка углеродного субстрата водородные бактерии усиленно синтезируют полимер  $\beta$ -оксималяной кислоты [5], доля которого может достигать 70-80% сухого веса клетки одновременно с падением содержания белков. При благоприятных условиях водородокисляющие бактерии содержат не более 1% полимера  $\beta$ -оксималяной кислоты. Оптимизация условий культивирования способствует обогащению этих бактерий белком, содержание которого достигает 60-70% веса сухой биомассы [3, 5].

Таким образом, в связи со специфическим биохимическим составом одноклеточных организмов и, в первую очередь, с особенностями их азотсодержащих компонентов эти организмы представляют значительный интерес. Первостепенная важность решения задачи по изысканию новых, перспективных методов промышленного производства пищевых и кормовых белковых продуктов диктует необходимость расширения работ по изучению биохимических особенностей клеток микроорганизмов, вопросов их перевариваемости, доступности их белков для протеолитических ферментов, пригодности для пищевого и кормового использования.

### 1.3 Биологическая ценность белков и определяющие ее факторы

Биологическая ценность — это мера доли поглощенного белка из пищи, которая становится включенной в белки организма. Она зависит от состава аминокислот и других особенностей белка [34, 36]. На практике, при исследовании пищевой пригодности того или иного продукта, биологическую ценность его белков определяют при скормливании экспериментальным животным самого продукта, а не выделенных из него белков [44].

Хотя пищевое качество белков должно определяться биологическим путем, существует необходимость в экспериментах *in vitro*, которые могли бы предсказывать биологическую ценность белков на основании их химического состава. Такая необходимость возникает, например, в связи с трудоемкостью и длительностью некоторых биологических методов проведения исследований. Для биологических методик характерен также значительный разброс получаемых данных, они не точны при выявлении чрезвычайно низкой или нулевой биологической ценности [45].

Исследование химического состава и опыты по перевариванию белков *in vitro* являются естественным дополнением биологических методов в изучении продуктов питания. Например, изучение химического состава пищевых продуктов имело важное значение в определении роли различных веществ в питании и формировании концепции о его незаменимых факторах, не синтезируемых организмом.

Значительные успехи, достигнутые в изучении метаболизма отдельных аминокислот в организме человека и животных, создали предпосылки к развитию современной концепции о сбалансированном по аминокислотному составу идеальном белке [45, 46].

По литературным данным известно [3, 46], что биологическая ценность белков, в первую очередь, определяется их аминокислотным составом, а для человека, главным образом, содержанием незаменимых аминокислот. Причем, было показано, что необходимое количество фенилаланина в рационе может

быть снижено за счет добавления в него тирозина, а цистин снижает потребность в метионине [45].

О биологической ценности судят на основании, так называемого, «химического (аминокислотного) скор» [37, 38]. Расчет ведется в сравнении с составом аминокислот «идеального» белка (для взрослого человека применяют аминокислотную шкалу ФАО/ВОЗ). Аминокислотный скор – это процентное содержание аминокислоты в исследуемом белке по отношению к ее содержанию в «идеальном» белке (100%):

$$\text{СКОР АК} = \frac{\text{Содержание аминокислоты (в мг.) в 1 г. испытуемого белка}}{\text{Содержание аминокислоты (в мг.) в 1 г. идеального белка}} \times 100$$

Аминокислота, скор которой меньше 95%, лимитирует биологическую ценность белка. Если лимитирующих аминокислот нет, то белок пищевого продукта считается полноценным.

К «идеальным» более близки белки животных продуктов. У большинства растительных белков недостает незаменимых аминокислот: белки злаковых культур неполноценны по лизину и метионину [38].

Для суждения о пищевом качестве исследуемого белка рекомендовано вычисление индекса Е/Т, характеризующего отношение суммы незаменимых аминокислот к общему азоту препарата [45].

Сбалансированность незаменимых аминокислот в составе белка играет важнейшую роль для его усвоения организмом. Таким образом, добавление дефицитных аминокислот к диете, в большинстве случаев, улучшает белковую утилизацию [37, 38]. Обычно, к диете, содержащей белки одноклеточных организмов, добавляли метионин.

Нужно заметить, что дефицит серосодержащих аминокислот в биомассе одноклеточных организмов, обладающей, кроме того, низкой перевариваемостью, может быть усугублен некоторыми обстоятельствами. Трудноперевариваемые белки вызывают увеличение секреции панкреатических ферментов организмом [45]. Так как последние богаты серосодержащими

аминокислотами, повышенный синтез панкреатических ферментов будет вызывать недостаток метионина и цистина, необходимых для синтеза других тканевых белков. Таким образом, уже существующий дефицит серосодержащих аминокислот будет нарастать.

Метод аминокислотного сора позволяет рассматривать вопрос о биологической ценности белков только с позиций содержания в них незаменимых аминокислот без учета других факторов и, таким образом, дает представление лишь о потенциальных возможностях исследуемых белков удовлетворять потребности животного организма. Причем, в этом методе основное внимание уделяется аминокислотному дефициту, в то время как и значительный избыток отдельных аминокислот в диете может приводить к неблагоприятным последствиям для организма. Иногда это связано с явлением, получившим название аминокислотного антагонизма: избыток одной аминокислоты в диете увеличивает потребность в структурно сходных с ней аминокислотах [38]. Два классических примера – антагонизм аминокислот с разветвленной цепью (лейцин и изолейцин) и взаимодействие между аргинином и лизином. Антагонизм этих аминокислот наблюдается у различных видов животных [47].

Часто предсказать биологическую ценность белков с достаточной точностью только на основе их общего аминокислотного состава не удастся, так как существуют и другие обстоятельства, влияющие на утилизацию белка. Кроме общего аминокислотного состава немаловажное значение имеет скорость освобождения аминокислот из белка при ферментативном гидролизе, которая, в свою очередь, определяется доступностью пептидных связей и их атакуемостью протеолитическими ферментами [45]. Значительное место в оценке продуктов питания имеет изучение степени протеолиза белков, входящих в состав этих продуктов. Как неоднократно доказывалось, перевариваемость продуктов питания зависит от типа входящих в них белков, доступности самих этих белков для ферментов, предварительной обработки продуктов [45, 48]. В то время как аминокислотный состав большинства

пищевых продуктов хорошо изучен [37], вопросы их перевариваемости исследованы недостаточно. Тем более, это относится к объектам, которые только могут претендовать на пищевое или кормовое использование.

Одним из методов изучения биологической ценности пищевых продуктов является ферментативный гидролиз, когда доступность атакуемых пептидных связей определяется не только свойствами белка, но и структурой и химическим составом пищевого продукта [45]. Таким образом, постулируется предложение, согласно которому одним из главных факторов, определяющих способность аминокислот пищевого продукта усваиваться организмом человека или животных, является доступность белка для протеолиза. Это вызывает необходимость рассмотрения основных причин, влияющих на доступность белков одноклеточных организмов для протеолитических ферментов.

Клетки водорослей и бактерий обладают особым типом оболочек, возможности перевариваемости которых также, как и проницаемости для протеолиза, мало изучены. По данным ряда авторов клеточная оболочка этих организмов является одним из факторов, ограничивающих возможности переваривания их белковых компонентов [49]. Было отмечено существенное усиление протеолиза пепсином *in vitro* дрожжей [45], водорослей рода *Scenedesmus* при дезинтеграции их клеток. После разрушения в кавитационной мельнице в среде хлористого метилена клеток некоторых дрожжей и бактерий перевариваемость их белков пепсином и панкреатином увеличилась весьма значительно (для водородных бактерий перевариваемость пепсином возрастала в 1,2 раза, а панкреатином – в 1,4 раза) [50]. Необходимо, однако, отметить, не отрицая положительного значения клеточной дезинтеграции для перевариваемости их белков, что результаты могут быть объяснены не только разрушением, но и обезжириванием клеток в среде хлористого метилена и являются, таким образом, следствием дополнительного увеличения доступности белковых компонентов для протеолиза, вызванного удалением липидов. Например, известно, что после обезжиривания биомассы хлореллы 80%-ным этанолом, ее перевариваемость панкреатином увеличивалась



примерно на 40% [51]. По-видимому, одним из факторов, снижающих доступность белка для протеолиза, является его защищенность веществами липидной природы.

Наличие большого количества углеводов в некоторых одноклеточных организмах также, очевидно, является одной из возможных причин ограниченной доступности белков этих объектов для протеолитических ферментов. Так как растительные белки, в том числе белки водорослей, как правило, локализованы внутри целлюлозных структур, ограниченный контакт белка с ферментом может тормозить его перевариваемость [52]. Активность пепсина подавляется некоторыми сульфатсодержащими полисахаридами, такими как, гепарин, хондроитинсульфат, полисахарид из водорослей карагинин, сульфатированный амилопектин [45]. Ингибирующее действие полисахаридов является результатом их связывания с молекулами субстрата реакции. Многие растительные объекты содержат такие вещества, как фитиновая кислота, сапонины, фенольные вещества, различные сахара и металлы, способные образовывать комплексы с белками, устойчивые к действию протеиназ. Некоторые белки могут также оказывать ингибирующее действие на активность протеолитических ферментов, в первую очередь трипсина и химотрипсина, образуя с этими ферментами устойчивые соединения. Ингибиторы трипсина и химотрипсина обнаружены в большом количестве растительных объектов, особенно среди представителей бобовых [48].

Одним из методов оценки качества пищевых и кормовых продуктов является определение в них соотношения фракций белков различной растворимости. Этот метод основан на допущении, что доступность белков для ферментативного расщепления тесно связана с их растворимостью в растворах с различной ионной силой и рН. Обычно белки с низкой растворимостью имеют невысокую перевариваемость и наоборот [14]. Следовательно, степень растворимости белка является одним из показателей, влияющих на усвояемость аминокислот организмом человека и животных. Было установлено, например,

что снижение концентрации водосолерастворимых фракций белков ниже уровня 48,8% от общего содержания их в рационе отрицательно сказывается на продуктивности коров и использовании азота корма. По данным этих исследований, оптимальным уровнем водосолерастворимых фракций белков для жвачных, является примерно 50% от общего содержания белков в корме [35].

О том, что нерастворимые в солевых растворах клеточные белки плохо поддаются действию протеиназ, свидетельствуют и другие данные. Так, при действии субтилопептидазы А на мембраны *M. lysodeikticus* удалось переварить не более 30% белков препарата, причем мембраны не разрушались, а удалялись только поверхностные белки. Практически не переваривались щелочерастворимые белки, выделенные из дрожжей рода *Candida*, в то время как солерастворимые белки из тех же объектов легко поддавались протеолизу [14]. Причины подобных различий в перевариваемости отдельных белков пока до конца не выяснены.

Среди факторов, ответственных за белковую перевариваемость наряду с доступностью белков для протеиназ, необходимо назвать линейную последовательность аминокислот вблизи атакуемых ферментом связей. Хорошо известно, например, что трипсин обладает строгой специфичностью в отношении лизин- и аргининосодержащих связей, поэтому следует вывод, что максимальное количество пептидных связей, разрушаемых трипсином в белковой молекуле должно быть равно сумме аргининовых и лизиновых остатков. В то же время, далеко не безразлично, с какой из аминокислот образует связь лизин или аргинин. Так, было установлено, что пептидные связи «лизил-пролил» или «аргинил-пролил» полностью устойчивы к действию трипсина. Поэтому вполне вероятно, что высокое содержание пролина в сочетании с малым количеством лизина и аргинина увеличивает вероятность существования в белке «лизил-пролил» или «аргинил-пролиловых» связей [45]. Неоднократно делались попытки связать низкое качество тех или иных белков с содержанием в них специфических энзимустойчивых пептидов. Например, во

фракции арахина – белка, выделенного из арахиса, который отличается устойчивостью к протеолизу, обнаружены непропорционально высокие концентрации лизина и гистидина [35].

Перевариваемость пищевых белков зависит также от третичной структуры их молекул. Плотная укладка белков в глобулу, стабилизированная сульфгидрильными, водородными и гидрофобными связями, тормозит ферментативный процесс переваривания, поэтому денатурация молекул белка под действием различных физико-химических факторов (температуры, кислот, щелочей, окислителей и т.п.) может способствовать увеличению скорости их гидролиза. Так, при варке биомассы хлореллы перевариваемость ее белков увеличивалась по сравнению со свежей биомассой. Обработка белка, выделенного из соевых бобов, надмуравьиной кислотой для разрушения его дисульфидных связей, приводила к достоверному увеличению перевариваемости этого белка пепсином и трипсином *in vitro* [45].

К биохимическим критериям кормовой и пищевой ценности относят общее количество в нем белка, его фракционный и аминокислотный состав, а также перевариваемость протеолитическими ферментами [25].

Изучению фракционного состава белков животного, растительного, микробного происхождения посвящен ряд работ [14, 24], проводимых для решения вопросов систематики, определения питательной ценности и других задач теоретического и практического значения.

Соотношением легко- и труднорастворимых белковых фракций можно охарактеризовать исследуемый объект, сравнивая его с продуктами высокой пищевой и кормовой ценности. Это соотношение имеет принципиальное значение, характеризующее биологическую ценность исследуемых белков. Обычно белки с низкой растворимостью имеют невысокую перевариваемость и наоборот. Следовательно, степень растворимости белка является одним из показателей, влияющих на усвояемость его аминокислот животных организмом [45].

Фракционный состав белков одноклеточных организмов зависит от условий культивирования и, таким образом, его изучение может быть использовано для решения задач направленной селекции штаммов – продуцентов белка [14].

Для фракционирования белков применяют различные схемы, дающие обычно три или четыре белковые фракции, различающиеся своей растворимостью. Нами для определения питательной ценности микробных белков применялась методика, разработанная для фракционирования белков мышц. Полученные таким образом данные о растворимости белков в составе биомассы дают информацию, позволяющую делать выводы о питательной ценности исследуемого объекта.

Результаты аминокислотного анализа белковых фракций в совокупности с данными о распределении клеточных белков по растворимости могут характеризовать качество общего белка, которое определяется распределением общего фонда незаменимых аминокислот в составе клеточных белков менее или более доступных для пищеварительных ферментов [53].

#### **1.4 Биопродукты из водородокисляющих бактерий**

Водородокисляющие бактерии привлекли внимание исследователей еще в 1970-х годах как потенциальные продуценты одноклеточного белка [54], биомассы для ферментационной промышленности и полигидроксипутирата (ПГБ) [55]. Автотрофное культивирование микроорганизмов, окисляющих водород, составляет основу многих исследований с момента открытия этой специфической группы бактерий. Наиболее представительной и хорошо изученной бактерией, окисляющей водород, является *Cupriavidus necator*, название которой за эти годы претерпело несколько изменений: *Hydrogenomonas eutrophus*, *Ralstonia eutropha*, *Wautersia eutropha* и *Alcaligenes eutropha* [56]. Внимание, уделяемое этому штамму, связано с его универсальным метаболизмом, то есть способностью легко переключаться

между гетеротрофным и автотрофным режимами роста, используя органические соединения или молекулярный  $H_2$  в качестве источников энергии, как альтернативно, так и одновременно [57].

Стехиометрия автотрофного роста клеток *Cupriavidus necator*, как указано [58], является следующей:



Однако указанное здесь молярное соотношение потребления газообразного субстрата ( $H_2/O_2/CO_2$ ) может измениться при рассмотрении других штаммов и зависит от условий и скорости роста [59]. Наиболее распространенные соотношения составляют:  $H_2/O_2/CO_2 = 7:1:1$  [60] или  $7:2:1$  [61]. В этом случае важным метаболическим параметром является отношение поглощения  $H_2$  к поглощению  $CO_2$ , которое регулируется балансом между расходом катаболической энергии и уровнем, на котором электроны попадают в дыхательную цепь. Значения  $H_2/CO_2$  в диапазоне от 4 до 10 были признаны наиболее подходящими для роста этих микроорганизмов [59]. Многие исследования показали решающую роль, которую концентрация кислорода играет в метаболизме аэробных водородокисляющих бактерий. Он необходим в качестве конечного акцептора электронов, однако инактивирует ферменты гидрогеназы, если они присутствуют выше определенных пределов [62]. В более ранних исследованиях *Cupriavidus necator* [55] было указано, что ингибирование роста кислородом зависит от штамма, при этом ингибирование роста наблюдалось уже при концентрациях  $O_2$ , равных 4%. Хотя недавно была обнаружена, что СО-толерантная бактерия *Ideonella sp. O-1* способна расти при уровнях  $O_2$  более 30% [60].

Среди интересных особенностей метаболизма бактерий, окисляющих водород, все большее внимание уделяется накоплению биополимеров, в частности, путем использования чистых культур *Cupriavidus necator*. И поскольку более ранние исследования показали, насколько хорошо оно проходит, особенно в условиях ограничения кислорода [55], автотрофное

культивирование этих микроорганизмов для производства ПГБ изучалось разными группами исследователей [61]. Этот процесс рассматривался как возможный способ связывания CO<sub>2</sub> во время производства биоразлагаемых и возобновляемых биополимеров [61, 63]. В некоторых исследованиях была выявлена возможность использования устойчивых к CO водородных бактерий для производства ПГБ на промышленных выбросах, богатых H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> и CO [60, 64].

Полигидроксibuтират используется бактериями в качестве накопителя энергии. Они накапливают избыток углерода в виде биополимеров, когда низкие концентрации других соединений, таких как кислород или питательные вещества, ограничивают их рост [56]. Стехиометрию накопления ПГБ у *Cupriavidus necator* можно выразить следующим образом [63]:



Следовательно, теоретически можно собрать 1,3 кг ПГБ на 1 кг метаболизированного H<sub>2</sub>, что в энергетическом выражении соответствует 0,16 кг ПГБ/кг H<sub>2</sub>-ХПК. Высокий вес ПГБ на 1 кг H<sub>2</sub> объясняется тем фактом, что водород является самой легкой из существующих молекул.

Автотрофный ПГБ может использоваться в качестве микробного белка с профилем незаменимых аминокислот, близким к высококачественному белковому составу животного происхождения (с конечным содержанием белка до 70%), что делает их подходящим кандидатом в качестве источника белка для кормов для животных и, возможно, питание человека.

## **1.5 Влияние концентрации источника азота на рост микроорганизмов и синтез полимера**

Соотношение углерода к азоту в питании микроорганизмов оказывает существенное влияние на биологические процессы, происходящие в клетке, поэтому подбор оптимального соотношения C:N для каждого биологического

объекта позволяет получить максимальные ростовые и продукционные характеристики производственного штамма.

Соотношение углерода к азоту является важным показателем не только для роста и накопления полимера культурой *Cupriavidus necator* В-10646, но и для других организмов и биоценозов в целом.

Возьмем к примеру группу фотолитотрофных водорослей, обитающие в океане. Для их роста главным являются соотношение углерода к азоту в водной среде. Если в среде обитания соотношение углерода к азоту около 5, то данные бактерии будут содержать в себе много белка. Если больше, то бактерии содержат больше энергоемких молекул [65]. Для роста дрожжей *Hansenula polymorpha*, существуют несколько режимов культивирования. В исследовании углеродными компонентами среды являлись метанол и глюкоза, в качестве азота использовали соли аммония. В первом режиме среда с соотношением С:N 12 привела к углеродно-ограниченному росту (высокое содержание клеточного белка, низкое содержание углеводов), и в этих условиях использовались глюкоза и метанол одновременно. Среда с коэффициентом С:N>31 привела к азотно-ограниченному росту (низкому содержанию белка, но высокому содержанию углевода в клетках) и клетки усваивали только глюкозу. Переходный режим роста наблюдался во время роста на средах с промежуточными соотношения С:N ( $12 < \text{C:N} < 31$ ). В этом случае были выявлены изменения углеродного обмена, клеточного и ферментативного состава клеток [66]. С увеличением соотношения С:N в питательной среде происходит постепенное подавление синтеза, обнаружены метанол-ассимилирующие и разнородные ферменты.

*Bacillus megaterium* способен производить крупные количества ПЗГБ, достигая накопления полимера около 70% без ограничения азота. При минимизации субстрата хороший рост и накопление ПГА был виден при соотношении С:N около 8 [67].

При работе с культурой бактерий *Pseudomonas putida* GPO1 максимальный рост и накопление полимера было при соотношении C:N – 18,3 [68].

По мнению различных исследователей, когда содержание ПГА в цитоплазме высокое или условия культивирования неблагоприятны для роста клеток, например, высокие температуры, воздействие стрессовых факторов или конкуренция за пространство и питательные вещества, клетка может непрерывно синтезировать и выделять белки в окружающую среду, увеличивая присутствие аминокрупп в культуральной среде.

Согласно исследованиям, когда уровень источника азота ограничен, бактерии увеличивают активность ПГА-синтазы - фермента, ответственного за выработку ПГА [69].

Как показывают исследования, увеличение соотношения C:N способствуют накоплению ПГА, в то время как для роста клеток наблюдается обратный эффект. В исследовании с использованием *Pseudomonas entomophila* соотношение C/N оказывало значительное влияние на накопление и состав ПГА. Повышенное соотношение C/N в культуральной среде приводило к увеличению накопления ПГА с 0,5 до 33,5%, хотя и наблюдалось негативное влияние на рост клеток [70]. В другом исследовании было зарегистрировано накопление ПГА до 70% (в перерасчете на сухой вес биомассы бактерий) без ограничения питательных веществ с использованием *P. putida* KT2440 [71].

Большинство исследований автотрофных водородокисляющих бактерий проводилось при относительно низких концентрациях аммония (~1 г N–NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/л), однако в недавней работе [72] изучалось влияние высоких концентраций аммония и различных форм азота на рост *Cupriavidus necator* 335 и производство микробного белка. Рост клеток немного подавлялся при 2 г N–NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/л и полностью подавлялся при 4 г N–NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/л. Инокулят из ранней стадии экспоненциальной фазы лучше приспособился к ингибированию. Мочевина была наиболее предпочтительным источником азота, за ней следовали нитрат и аммоний. Ни концентрация аммония (в пределах 2 г N/л),



ни различные источники азота существенно не меняли профили аминокислот. Это исследование показало, что отходы, содержащие высокую концентрацию аммония (например, дигестат) или с различными формами азота (например, моча), могут использоваться в качестве источника азота для производства микробного белка и, таким образом, расширения исходного сырья.

## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Объект исследования

В данном исследовании использовался штамм водородокисляющих бактерий *Cupriavidus necator* В-10646, депонированный в ВКПМ.

*C. necator* является грамотрицательной, палочковидной, факультативной хемолитоавтотрофной  $\beta$ -протеобактерией. Первоначально она описывалась как *Hydrogenomonas eutropha* и была предметом частых таксономических реклассификаций: *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes eutrophus*, *Wautersia eutropha* [73].

Водородокисляющие бактерии - грамотрицательные неспоровые подвижные палочки с немногими (от 1 до 5) жгутиками, расположенными перитрихально. Молодые клетки обычно с одним жгутиком. Размеры варьируют в пределах 1,8-2,6×0,7 мкм. В стационарной фазе клетки удлиненные. Слизи не образуют. Запасным веществом является полигидроксимасляная кислота до 70% от веса клетки. Размножаются делением пополам. Одиночные, в парах, редко в коротких цепочках. Колонии округлые, светлые, непрозрачные, блестящие, быстро приобретают серовато-коричневую окраску, край колонии имеет характерные небольшие доли. В жидких средах рост диффузный, даже в неподвижных пробирках не образует пленки. Хемолитотрофы, облигатные аэробы, сахара не сбраживают. Органотрофный рост происходит на более чем 100 различных органических веществах. Не обладают гидролитическими ферментами. Из углеводов используют фруктозу и легко образуют мутанты, растущие на глюкозе. Легче всего используют органические кислоты, аминокислоты. Спирты не используют, растут на ароматических соединениях. Источниками азота выступают аммоний, нитраты, нитриты, аминокислоты, амины, мочевины, ряд азотистых оснований [19, 74].

Как вездесущий обитатель почвы и пресной воды, *C. necator* хорошо приспособлен к постоянно меняющимся условиям. Метаболическая универсальность этого микроорганизма сделала его модельным в

микробиологии в отношении водородной хемолитоавтотрофии и синтеза поли-3-гидроксибутирата. Хотя аэробное дыхание играет основную роль в метаболизме *C. necator* может использовать нитрат и нитрит в качестве акцепторов электронов в условиях аноксии. При гетеротрофном росте разнообразные углеводы, липиды и органические кислоты служат источником углерода и энергии, тогда как в отсутствии органических соединений, смесь  $H_2$ ,  $CO_2$  и  $O_2$  позволяет *C. necator* расти автотрофно. В зависимости от ситуации в среде обитания *C. necator* может легко переключаться между автотрофией и гетеротрофией. Миксотрофный рост наблюдается, когда *C. necator* использует одновременно органические и неорганические субстраты в качестве источника углерода и энергии.

## 2.2 Культивирование бактерий

*Cupriavidus necator* В-10646 культивировали в периодической автотрофной культуре в стеклянных колбах объемом 0,5 л, заполненных культурой на 20%, на термостатируемой качалке при 30°C в течение 96 часов. Источником углерода и энергии выступала смесь газов ( $CO_2$ ,  $H_2$ ,  $O_2$ ) с соотношением 1:2:7 по объему, которую с помощью компрессора непрерывно прокачивали через культуру. За основу взята солевая среда Шлегеля (г/л):  $Na_2HPO_4 \cdot H_2O$  – 9,1;  $KH_2PO_4$  – 1,5;  $MgSO_4 \cdot H_2O$  – 0,2;  $Fe_3C_6H_5O_7 \cdot 7H_2O$  – 0,25; а также разные концентрации источника азотного питания ( $NH_4Cl$ ) – 0,3, 0,5, 0,7, 0,8 и 1,0 г/л в зависимости от эксперимента. Стандартный раствор микроэлементов по Хоагланду (из расчета 3 мл стандартного раствора на 1 л среды) содержит (г/л):  $H_3BO_3$  – 0,228;  $CoCe_2 \cdot 6H_2O$  – 0,03;  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  – 0,008;  $MnCe_2 \cdot 4H_2O$  – 0,008;  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0,176;  $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$  – 0,050;  $NiCe_2$  – 0,008.

Изменение биомассы клеток в процессе роста культуры регистрировали оптическими показателями культуры. Периодически отбирали пробы культуры и измеряли оптическую плотность на

фотоколориметре при  $\lambda=440\text{нм}$ . Использовали разведение культуры с дистиллированной водой в соотношении 1:5. В качестве контроля использовали дистиллированную воду.

### **2.3 Определение сухой биомассы клеток**

Для определения биомассы использовали весовой метод. 25 мл бактериальной суспензии центрифугировали 8 мин при 6000 g, после чего осадок промывали дистиллированной водой и вновь центрифугировали. Данную процедуру повторяли два раза. Полученную биомассу переносили в бюксы, доведенные до постоянного веса, и размещали в сушильном шкафу при 105°C в течение 24 ч, после охлаждали и взвешивали. Вес биомассы определяли, как разницу между весом бюкса, содержащим биомассу, и его исходным весом.

### **2.4 Определение содержания и состава ПГА**

Определяли хроматографией метиловых эфиров жирных кислот после метанолиза на хромато-масс-спектрометре. К навеске сухой биомассы (3,9-4,5 мг) добавляли 1 мл внутреннего стандарта (0,5 мг бензойной кислоты/1 мл хлороформа), 0,85 мл метанола и 0,15 мл концентрированной  $\text{H}_2\text{SO}_4$  и выдерживали на водяной бане под обратным холодильником 2 ч 40 мин. После метанолиза в колбу добавляли 1 мл дистиллированной воды.

### **2.5 Изучение биохимического состава биомассы бактерий**

Концентрацию клеток в культуре регистрировали нефелометрически на фотоколориметре с пересчётом по калибровочной кривой на вес сухой биомассы, концентрацию белка определяли по Лоури, с применением калибровочного графика для бычьего сывороточного альбумина, углеводы –

антроновым методом, липиды - концентрировали с помощью аппарата Сокслета [27].

Внутриклеточную концентрацию общего азота определяли по методике Кьельдаля [30]. Для анализа использовали навески сухой биомассы массой 40 мг, приливали по 2 мл концентрированной  $H_2SO_4$  и помещали в песочную баню на 40 мин, затем добавляли по 1,5 мл  $H_2O_2$  и снова помещали в песочную баню на 1,5 часа. Проводили разведение в 200 раз. Оптическую плотность измеряли на фотоколориметре ( $\lambda = 440$  нм). Концентрацию общего азота и белка рассчитывали по калибровочному графику.

## 2.6 Определение аминокислотного состава белка биомассы бактерий

Для качественного и количественного определения аминокислот, содержащихся в гидролизате исследуемого объекта, использовали модифицированный метод Мура и Штейна [46]. Принцип метода состоит в разделении смеси аминокислот на составляющие компоненты по методу элюционной ионообменной хроматографии. После произведения реакции с нингидрином проводится колориметрическая оценка элюата. Качественное определение аминокислот проводили по положению пиков на графике, причем относительная ошибка определения времени элюции составляла для автоматического анализатора KLA – 3B «Хитачи» (Япония), используемого в данной работе,  $\pm 1\%$ . Количественное определение основано на сравнении площадей пиков аминокислоты в исследуемом образце и в стандартной смеси аминокислот. В качестве внутреннего стандарта использовали норлейцин (Reanal).

Содержание аминокислот (% от веса взятой навески) вычисляли по формуле (1).

$$\text{Аминокислота} = \left(\frac{S}{C}\right) * A * M * V * \left(\frac{100}{P}\right), \quad (1)$$

где  $S$  – отношение площадей пиков аминокислоты и норлейцина в исследуемом образце;

$C$  – то же в стандартной смеси аминокислот;

$A$  – количество микромолей соответствующей аминокислоты в 1 мл стандартной смеси аминокислот (равно 0,5);

$M$  – вес одного микромоля аминокислоты в мг;

$V$  – объем разведения сухого образца в цитратном буфере (рН 2,2);

$P$  – навеска образца в мг.

### **2.6.1 Подготовка исследуемого материала к проведению общего аминокислотного анализа**

Образцы, предназначенные для анализа, высушивали и гидролизовали 6 N раствором соляной кислоты (10 мл) в специальных запаянных ампулах. Использовали лиофильно высушенную биомассу водородокисляющих бактерий. Навеску для проведения гидролиза брали из расчета содержания в ней не менее 5 и обычно не более 25 мг «сырого протеина», определяемого по общему азоту ( $N \times 6,25$ ). Гидролиз проводили в запаянных ампулах с 6 N соляной кислотой, в течение 22 часов при 110°C. Затем содержимое переносили в фарфоровые чашки. Для этого ампулы ополаскивали дистиллированной водой, фильтровали через обеззоленный фильтр и упаривали с дистиллированной водой на водяной бане при 50°C. Сухой гидролизат растворяли в Na-цитратном буфере (рН 2,2) из расчета 1 мл буфера на 1 мг «сырого протеина», содержащегося в препарате, и использовали для анализа.

### **2.6.2 Анализ серосодержащих аминокислот**

При кислотном гидролизе происходит частичное разрушение серосодержащих аминокислот – метионина, цистина и цистеина. Для их количественного определения наилучшие результаты получены методом,

предусматривающим предварительное окисление белка надмуравьиной кислотой [31]. При окислении цистин и цистеин трансформируются в цистеиновую кислоту, а метионин – в метионинсульфон. В дальнейшем при гидролизе белка соляной кислотой эти соединения практически не разрушаются, а при хроматографии выходят отдельными пиками. Таким образом, такой метод позволяет определять суммарное содержание цистина и цистеина в препарате.

Окисление белка производили следующим образом: 50 мг образца помещали в фарфоровую чашку и добавляли 25 мл надмуравьиной кислоты, которую готовили, предварительно, смешением 9 частей 85%-ной муравьиной кислоты и 1 части 33%-ной перекиси водорода. Пробу оставляли на ночь в холодильнике. После этого раствор выпаривали досуха и осадок количественно переносили в ампулу, смывая его со стенок чашки 6 N раствором HCl. Гидролиз проводили в 10 мл 6 N HCl в специальных запаянных ампулах в течение 18 часов при 110°C. Дальнейшую подготовку образца проводили так, как описано для общего анализа. Серосодержащие аминокислоты хроматографировали по общей программе до выхода с колонки метионинсульфона.

### **2.6.3 Определение триптофана**

Для определения триптофана использовали химический метод Хорна, описанный в обзоре Алексеенко [32]. Для этого 100 мг биомассы гидролизовали с 2 мл 5 N NaOH на кипящей водяной бане с воздушным холодильником в течение 1 часа.

Затем объем гидролизата доводили дистиллированной водой до 10 мл. К 0,5 мл полученного раствора добавляли 2,5 мл 0,5%-ного раствора п-диметиламинобензальдегида в концентрированной соляной кислоте. Смесь выдерживали в темноте в течение 30 мин и добавляли 2,5 мл абсолютного этанола и 1-2 капли свежеприготовленного 0,2%-го раствора NaNO<sub>2</sub>. После

перемешивания раствор колориметрировали ( $\lambda = 750$  нм) и количественно определяли содержание триптофана по калибровочной кривой.

В случае сильно пигментированных препаратов, окраска которых мешала проведению реакции по вышеописанному методу, триптофан определяли методом Лоренцо-Андрю и Франдзена, изложенном в методическом руководстве Ярош [33]. Определение триптофана в этом случае основано на образовании окрашенных продуктов реакции триптофана с азотной кислотой в присутствии серной кислоты.

В колбу для гидролиза помещали 1 г материала, 10 мл дистиллированной воды и 40 мл сульфонитратной смеси (дистиллированная вода,  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). Гидролиз вели в течение 1 часа на кипящей водяной бане. Гидролизат фильтровали и определяли интенсивность его окрашивания на КФК-2МП ( $\lambda = 440$  нм). Расчет содержания триптофана производили по калибровочной кривой.

## **2.7 Фракционирование клеточных белков в системе растворителей возрастающей ионной силы и pH**

Фракционный состав является важным показателем, определяющим биологическую ценность белка. Фракционирование основано на разной растворимости клеточных белков в солевых и щелочных растворах.

Перед фракционированием белков исследуемых бактерий необходимо разрушить их клеточную стенку [75-77]. Дезинтеграцию клеток данных бактерий производили с помощью ультразвукового дезинтегратора (Misonix 3000, США).

Биомассу ресуспендировали 1:10 в 5 мМ Трис-НСl буфере (pH 7,0). Клетки разрушали ультразвуковой обработкой на ледяной бане. Клеточный дебрис удаляли центрифугированием 18000 g в течение 15 мин при 5°C [75].

Фракционирование белков разрушенных бактерий производили по схеме, описанной в работе Ткаченко [14]. Метод заключается в последовательном



выделении белковых фракций растворителями возрастающей ионной силы и рН. Белки экстрагировали на магнитных мешалках MRHei-Standart «Heidolph» (Германия) в конических колбах с плоским дном.

После разрушения клеток в 0,03 М растворе KCl (плотность суспензии – до 60 мг сухого вещества в 1 мл) дезинтеграт центрифугировали 18000 g при 5°C в течение 40 минут на центрифуге Eppendorf 5810R (Германия). Нерастворимый осадок еще 4 раза экстрагировали 0,03 М раствором KCl каждый раз по одному часу. Экстракты отделяли центрифугированием при тех же условиях и объединяли, они составляли I фракцию.

II фракцию образовывали белки, экстрагированные чередующейся обработкой биомассы раствором Вебера (0,6 М KCl, 0,04 М NaHCO<sub>3</sub> и 0,01 М Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). Первая подфракция получена после 20-ти часовой экстракции, все остальные экстрагировали по часу.

III фракция была получена при обработке остатка биомассы 0,1 N раствором NaOH. Первое экстрагирование продолжали 2 часа, последующие два – по 1 часу.

1 N раствором NaOH при нагревании до 65°C из остатка биомассы извлекали белки IV фракции. Количество подфракций – три. Продолжительность извлечение каждой – 1 час.

Количество белка, экстрагированное в результате такой обработки, определяли по методу Лоури [78]: при образовании биуретовый комплекс в присутствии фенола дает характерную окраску пропорционально количеству белка, с поправкой на фолинпозитивные вещества небелковой природы, неосаждаемые 10%-ным раствором трихлоруксусной кислоты.

Оптическую плотность измеряли на фотоколориметре КФК-2МП ( $\lambda=750$  нм). Концентрацию белка рассчитывали по калибровочному графику.

### **3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ**

Изъято 9 страниц

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С целью определения биологической ценности белков, синтезируемых водородокисляющими микроорганизмами, исследовано влияние различных концентраций хлорида аммония в культуре *Cupriavidus necator* В-10646 на накопление биомассы и соотношение в ней белок/полимер. Показано, что урожай биомассы и соотношение основных и запасных компонентов в ней зависят от концентрации  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Максимальное содержание белка получено при концентрации  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1,0 г/л; полимера – при лимитировании роста по азоту и концентрации 0,3 г/л.

Исследован биохимический состав биомассы и определено, что на полной среде она в основном содержит азотсодержащие компоненты (белки) и в незначительных количествах углеводы и липиды.

Исследованы аминокислотный и фракционный состав белка, синтезируемого *Cupriavidus necator* В-10646. Лимитирующими биологическую ценность белков водородокисляющих бактерий являются серосодержащие аминокислоты и изолейцин. По количеству синтезированного белка и содержанию в нем незаменимых аминокислот, водородокисляющие бактерии превосходят растительный белок.

Белки, синтезируемые *Cupriavidus necator* В-10646, по фракционному составу значительно отличаются от традиционных белков. Показано, что больше половины белков *C. necator* В-10646 представлены фракциями I и II. Белки III и IV фракций экстрагируются щелочью и менее доступны протеазам, а потому хуже перевариваются, чем белки фракций I и II.

По сумме незаменимых аминокислот белковые фракции III и IV *Cupriavidus necator* В-10646 превосходят фракции зерна пшеницы.

Таким образом, показано, что варьируя концентрацию азота в среде можно контролировать соотношение основных и запасных компонентов в синтезируемой биомассе клеток *C. necator* В-10646. Белки исследованных водородокисляющих микроорганизмов по содержанию аминокислот и

фракционному составу превосходят традиционные белки растительного происхождения.

Высокий уровень содержания общего белка в биомассе *Cupriavidus necator* В-10646 и полноценный аминокислотный состав позволяют рассматривать водородокисляющие микроорганизмы в качестве потенциального продуцента белка пищевого назначения.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Bothe, H. Heterotrophic bacteria growing in association with *Methylococcus capsulatus* (Bath) in a single cell protein production process / H. Bothe, K. Moller Jensen, A. Mergel, J. Larsen, C. Jorgensen, H. Bothe, L. Jorgensen // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2002. – V. 59. – P. 33–39.
2. Anderson, P. J. Thermotolerant single cell protein production by *Kluyveromyces marxianus* var. *Marxianus* / P. J. Anderson, K. E. McNeil, K. Watson // *J Ind Microbiol Biotechnol.* – 1988. – V. 3. – P. 9-14.
3. Ravindra, P. Value-added food: Single cell protein / P. Ravindra // *Biotechnol Adv.* – 2000. – V. 18. – №6. – P. 459-479.
4. Nasser, A. Single Cell Protein: Production and Process / A. Nasser, S. Rasoul-Amini, M. Morowvat, Y. Ghasemi // *Am J Food Tech.* – 2011. – V 6. – P. 103-116.
5. Волова, Т. Г. Биосинтез на водороде / Т. Г. Волова; под ред. И. И. Гительзона; Рос. акад. наук, Ин-т биофизики СО РАН. – Новосибирск: изд-во СО РАН, 2004. – 398 с.
6. Doucha, J. Influence of processing parameters on disintegration of *Chlorella* cells in various types of homogenizers / J. Doucha, K. Livansky // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2008. – V. 81. – P. 431–440.
7. Fabregas, J. Marine microalgae as a potential (SCP) / J. Fabregas, C. Herrero // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 1985. – V. 23. – P. 110-113.
8. Rajoka, M. I. Kinetics of batch single cell protein production from rice polishings with *Candida utilis* in continuously aerated tank reactors / M. I. Rajoka, S. H. Khan, M. A. Jabbar, M. S. Awan, A. S. Hashmi // *Bioresource Technol.* – 2006. – V. 97. – P. 1934-1941.
9. Nigam, J. N. Cultivation of *Candida langeronii* in sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolyzate for the production of single cell protein / J. N. Nigam // *World J Microbiol Biotechnol.* – 2000. – V. 16. – P. 367-372.

10. Akimova, G. P. Low temperature impact on protein content and peroxidase activity during pea inoculation with *Rhizobium leguminosarum* / G. P. Akimova, M. G. Sokolova // J Stress Physiol Biochem. – 2010. – V. 6. – №4. – P. 81-89.
11. Zhao, C. Single cell protein production from yacon extract using a highly thermosensitive and permeable mutant of the marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a and its nutritive analysis / C. Zhao, T. Zhang, Z-M. Chi, Z. Chi, J. Li, X. Wang // Bioprocess Biosyst Eng. – 2010. – V. 33. – P. 549–556.
12. Rajoka, M. I. Production of single cell protein through fermentation of a perennial grass grown on saline lands with *Cellulomonas biazotea* / M. I. Rajoka // World J Microbiol Biotechnol. – 2005. – V. 21. – P. 207–211.
13. Bhalla, T. C. Production of Metabolites, Industrial Enzymes, Amino Acid, Organic Acids, Antibiotics, Vitamins and Single Cell Proteins / T. C. Bhalla, N. N. Sharma, M. Sharma // National Science Digital Library India. – 2007.
14. Ткаченко, В. В. Влияние условий культивирования на фракционный состав белков микроорганизмов / В. В. Ткаченко, С. С. Рылкин, А. Н. Шкидченко, В. Э. Стеркин // Микробиология. – 1971. – № 40. – С. 651-655.
15. Omar, S. Microbial Biomass and Protein Production from Whey / S. Omar, S. Sabry // Med J Islamic World Acad Sci. – 1991. – V. 4. – №2. – P. 170-172.
16. Пономарев-Степной, Н. Н. Атомно-водородная энергетика-пути развития / Н. Н. Пономарев-Степной, А. Я. Столяревский // Энергия. – 2004. – №1. – С. 3-24.
17. Papanikolaou, S. Industrial derivative of tallow: a promising renewable substrate for microbial lipid, single-cell protein and lipase production by *Yarrowia lipolitica* / S. Papanikolaou // Electron J Biotechn. – 2007. – V. 10. – №3.
18. Zepka, L. Q. Nutritional evaluation of single-cell protein produced by *Aphanotheca microscopica Nageli* / L. Q. Zepka, E. Jacob-Lopes, R. Goldbeck, L. A. Souza-Soares, M. I. Queiroz // Bioresource Technol. – 2010. – V. 101. – P. 7107–7111.
19. Заварзин, Г. А. Водородные бактерии и карбоксидобактерии / Г. А. Заварзин. – М.: изд-во Наука, 1978. – 240 с.

20. Patil, R. S. Chitinolytic enzymes: an exploration / R. S. Patil, V. Ghromade, M. V. Deshpander // *Enzyme Microb Technol.* – 2000. – V. 26. – №7. – P. 473 – 483.
21. Duarte, L. Yeast Biomass Production in Brewery's Spent Grains Hemicellulosic Hydrolyzate / L. Duarte, F. Carneiro, S. Lopes // *Appl Biochem Biotechnol.* – 2008. – V. 148. – P. 119-129.
22. Kuzmanova, S. Production of mycelial protein and cellulolytic enzymes from food wastes / S. Kuzmanova, E. Vandeska, A. Dimitrovski // *J Ind Microbiol.* – 1991. – V. 7. – P. 257-262.
23. Moreno, J. M. Hydrolysis of Nucleic Acids in Single-Cell Protein Concentrates Using Immobilized Benzoylase / J. M. Moreno, J. M. Sanchez-Montero, A. Ballesteros, J. V. Sinisterra // *Appl Biochem Biotechnol.* – 1991. – V. 31. – P. 43-51.
24. Киреева, В. В. Исследование продуктов комплексной переработки фитомассы растений / В. В. Киреева. – Ростов н/Д. – Деп. ВИНТИ, 2010. – №44. – 195 с.
25. Аёшина, Е. Н. Аминокислотный состав белков надземной части *Ortilia sekunda* (L.) / Е. Н. Аёшина, Ж. А. Плынская, Н. А. Величко // *Химия растительного сырья.* – 2009. – №1. – С. 137-139.
26. Смольникова, Я. В. Химический состав растения и каллусной ткани *Digitalis purpurea* L. / Я. В. Смольникова, Н. А. Величко // *Химия растительного сырья.* – 2011. – №4. – С. 239-243.
27. Филиппович, Ю. Б. Биологическая химия: учебное пособие для студентов вузов / Ю. Б. Филиппович. – М., Академия, 2008. – 254 с.
28. Зарипова, Л. П. Пути увеличения производства кормового белка в республике Татарстан / Л. П. Зарипова, Ф. С. Гибадуллина // *Достижения науки и техники.* – 2008. – №11. – С. 36-37.
29. Остерман, Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот / Л.А. Остерман. – М.: МЦНМО, 2002. – 248 с.

30. Абакумова, Н. А. Органическая химия и основы биохимии: учебное пособие / Н. А. Абакумова, Н. Н. Быкова. – Тамбов: изд-во ГОУ ВПО ТГТУ, 2011. – Ч. 2. – 80 с.

31. Алексеенко, Л. П. Аминокислотный анализ белков, тканевых экстрактов и биологических жидкостей / Л. П. Алексеенко // Современные методы в биохимии: т. 1. / В. Н. Орехович [и др.]. – М.: Медицина, 1964. – Т.1. – С. 129-161.

32. Fleurence, J. Determination of the nutritional value of proteins obtained from *Ulva Armoricana* / J. Fleurence, E. Chenard, M. Lucon // J Appl Phycol. – 1999. – V. 11. – P. 231–239.

33. Ярош, Н. П. Определение триптофана в вегетативных частях растений / Н. П. Ярош // Методы биохимического исследования растений: изд. 2-е, перераб. и доп. / А. И. Ермаков [и др.]. – Л.: Колос, 1972. – С. 315-316.

34. Антипова, Л. В. Пищевая ценность и свойства мяса механической обвалки цесарки / Л. В. Антипова, С. В. Полянских, Д. Ю. Ковалев // Мясная индустрия. – 2011. – №.5. – С. 24-28.

35. Головкин, М. П. Перевариваемость *in vitro* белков мясных фаршевых изделий, приготовленных с использованием минерально-белково-жировой композиции / М. П. Головкин, М. Л. Серик // Восточно-Европейский журнал передовых технологий. – 2005. – 6/2. – № 18. – С. 190-193.

36. Ковалев, Д. Ю. Свойства и разработка технологии производства птицепродуктов широкого потребительского спроса из мяса цесарок: автореф. дис. ... канд. технических наук: 15.18.04 / Ковалев Денис Юрьевич. – Воронеж, 2011. – 24 с.

37. Химия пищи. Книга 1: Белки: структура, функции, роль в питании / И. А. Рогов, Л. В. Антипова, Н. И. Дунченко. – М.: Колос, 2000. – 384 с.

38. Рогов, И. А. Химия пищи: учеб. пособие для вузов / И. А. Рогов, Л. В. Антипова, Н. И. Дунченко. – М.: Колос, 2007. – 853 с.

39. Ahmadi, A. R. Determination of the Amount of Protein and Amino Acids Extracted from the Microbial Protein (SCP) of Lignocellulosic Wastes / A. R.



Ahmadi, H. Ghoorchian, R. Hajihosaini, J. Khanifar. // Pakistan J Biol Sci. – 2010. – V. 13. – №8. – P. 355-361.

40. Sichert, S. Extension of the Substrate Utilization Range of *Ralstonia eutropha* Strain H16 by Metabolic Engineering to Include Mannose and Glucose / S. Sichert, St. Hetzler, D. Broker, A. Steinbuchel // Appl Environ Microbiol. – 2011. – V. 77. – №4. – P. 1325–1334.

41. Барашков, В. А. К вопросу комплексного использования бактериальной биомассы / В. А. Барашков, Г. С. Калачева // Сибирский экологический журнал. – 1997. – №5. – С. 533 – 536.

42. Высоцкий, В. Г. Методические проблемы исследования качества новых источников пищевых белков / В. Г. Высоцкий, В. А. Тутельян // Обзорная информация. Медицина и здравоохранение. Серия: гигиена. – М., 1997. – 64 с.

43. Schlegel, H.G. Ein submersverfahren zur kulture wasserstoffoxydierenden bakterien: washtumfysiologische untersuchung / H. G. Schlegel, H. Kaltwasser, G. Gottschalk // Archiv Für Mikrobiol. – 1961. – V. 38. – P. 209-222.

44. Willetts, A. The Production of Single-Cell Protein from Whey / A. Willetts, U. Ugalde // Biotechnol Lett. – 1987. – №11. – P. 795-800.

45. Покровский, А. А. Атакуемость белков пищевых продуктов протеолитическими ферментами *in vitro* / А. А. Покровский, Е. Д. Ертанов // Вопросы питания. – 1965. – №3. – С. 38-44.

46. Smyth, D. G. The sequence of amino acid residues in bovine pancreatic ribonuclease: revisions and confirmations / D. G. Smyth, W. H. Stein, S. Moore // J Biol Chem. – 1963. – V. 238. – P. 227–234.

47. Ефимова, М. В. Ведение в прикладную биотехнологию: учеб. Пособие / М. В. Ефимова. – Петропавловск-Камчатский: КамчатГТУ, 2004. – 95 с.

48. Эльконин, Л. А. Кожемякин. Перевариваемость в условиях *in vitro* запасных белков и крахмала у ЦМС-линий, линий-восстановителей фертильности и гибридов F1 сорго с новыми типами стерильных цитоплазм / Л.

А. Эльконин, Ю. В. Итальянская, В. В. Кожемякин // Аграрный вестник Юго-Востока. – 2010. – №2 (5). – С. 12-16.

49. Данилевич, В. Н. Быстрая и эффективная экстракция растворимых белков из грамотрицательных микроорганизмов без разрушения клеточных стенок / В. Н. Данилевич, Л. Е. Петровская, Е. В. Гришин // Биоорганическая химия. – 2006. – Т. 32. – №6. – С. 579-588.

50. Ho1, C. W. Comparative Evaluation of Different Cell Disruption Methods for the Release of Recombinant Hepatitis B Core Antigen from *Escherichia coli* / C. W. Ho1, W. S. Tan, W. B. Yap, T. C. Ling, B. T. Tey // Biotechnol Bioprocess Eng. – 2008. – V. 13. – P. 577-583.

51. Milddelberg, A. P. J. Process-scale disruption of Microorganisms / A. P. J. Milddelberg // Biotechnol Adv. – 1995. – V. 13. – №3. – P. 491-551.

52. Сова, В. В. Выделение и очистка белков. Методич. Пособие / В. В. Сова, М. И. Кусайкин. – Владивосток: изд-во Дальневост. ун-та, 2006. – 42 с.

53. Иванов, И. И. Биохимия и патобиохимия мышц / И. И. Иванов, В. А. Юрьев. – Л.: Медгиз, 1961. – 275 с.

54. Repaske, R. Dense autotrophic cultures of *Alcaligenes eutrophus* / R. Repaske, R. Mayer // Appl Environ Microbiol. – 1976. – Vol. 32. – №4. – P. 592-597.

55. Siegel, R. S. Kinetics of *Alacligens eutropha* / R. S. Siegel, D. F. Ollis // Biotechnol Bioeng. – 1984. – Vol. 26. – P. 764-770.

56. Khosravi-Darani, K. Microbial production of poly(hydroxybutyrate) from C1 carbon sources / K. Khosravi-Darani, Z.-B. Mokhtari, T. Amai, K. Tanaka // Appl Microbiol Biotechnol. – 2013. – Vol. 97. – P. 1407-1424.

57. Pohlmann, A. Genome sequence of the bioplastic-producing “Knallgas” bacterium *Ralstonia eutropha* H16 / A. Pohlmann, W. F. Fricke, F. Reinecke, B. Kusian, H. Liesegang // Nat Biotechnol. – 2006. – Vol. 24. – P. 1-6.

58. Ishizaki, A. Batch culture of *Alcaligenes eutrophus* ATCC 17697 T using recycled gas closed circuit culture system / A. Ishizaki, K. Tanaka // J Ferment Bioeng. – 1990. – Vol. 69. – P. 170-174.

59. Schink, B. Hydrogen metabolism in aerobic hydrogen-oxidizing bacteria / B. Schink, H. G. Schlegel // *Biochimie*. – 1978. – Vol. 60. – P. 297-305.
60. Tanaka, K. Cell growth and P(3HB) accumulation from CO<sub>2</sub> of a carbon monoxide-tolerant hydrogen-oxidizing bacterium, *Ideonella sp.* O-1 / K. Tanaka, K. Miyawaki, A. Yamaguchi, K. Khosravi-Darani, H. Matsusaki // *Appl Microbiol Biotechnol*. – 2011. – Vol. 92. – P. 1161-1169.
61. Volova, T. G. Cell growth and accumulation of polyhydroxyalkanoates from CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> of a hydrogen-oxidizing bacterium, *Cupriavidus eutrophus* B-10646 / T. G. Volova, E. G. Kiselev, E. I. Shishatskaya, N. O. Zhila, A. N. Boyandin, D. A. Syrvacheva, O. N. Vinogradova // *Bioresour Technol*. – 2013. – Vol. 146. – P. 215-222.
62. Vignais, P. M. Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: an overview / P. M. Vignais, B. Billoud // *Chem Rev*. – 2007. – Vol. 107. – P. 4206-4272.
63. Tanaka, K. Production of poly(D-3-hydroxybutyrate) from CO(2), H(2), and O(2) by high cell density autotrophic cultivation of *Alcaligenes eutrophus* / K. Tanaka, A. Ishizaki, T. Kanamaru, T. Kawano // *Biotechnol Bioeng*. – 1995. – Vol. 45. – P. 268-275.
64. Volova, T. G. Autotrophic synthesis of polyhydroxyalkanoates by the bacteria *Ralstonia eutropha* in the presence of carbon monoxide / T. G. Volova, G. S. Kalacheva, O. V. Altukhova // *Appl Microbiol Biotechnol*. – 2002. – Vol. 58. – P. 675-678
65. Raven, J. Global aspects of C/N interactions determining plant - environment interactions / J. Raven, L. Handley, M. Andrews // *J Exp Bot*. – Vol. 55. – № 394. – 2004. – P. 11-25.
66. Egli, T. Influence of the Carbon:Nitrogen Ratio of the Growth Medium on the Cellular Composition and the Ability of the Methylophilic Yeast *Hansenula polymorpha* to Utilize Mixed Carbon Sources / T. Egli, J. R. Quayle // *Microbiology*. – 1986. – P. 1779-1788.

67. Faccin, D. Optimization of C:N ratio and minimal initial carbon source for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Bacillus megaterium* / D. Faccin, I. Martins, N. Cardozo, R. Rech, M. Ayub // Wiley Interscience. – 2009. – P. 22-40.

68. Hartmann, R. Tailored Biosynthesis of Olefinic Medium-Chain-Length Poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] in *Pseudomonas putida* GPo1 with Improved Thermal Properties / R. Hartmann, R. Hany, T. Geiger, T. Egli, B. Witholt, M. Zinn // Macromolecules. – 2004. – P. 6780-6785.

69. Rehm, B. Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis / B. Rehm, A. Steinbüchel // Int J Biol Macromol. – 1999. – Vol. 25. – № 1-3. – P. 3-19.

70. Yao, J. Production of polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas nitroreducens* / J. Yao // Antonie van Leeuwenhoek. – 1999. – Vol. 75. – №4. – P. 345-349.

71. Sun, Z. Carbon-limited fed-batch production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates from nonanoic acid by *Pseudomonas putida* KT2440 / Z. Sun // Appl Microbiol Biotechnol. – 2007. – Vol. 74. – №1. – P. 69-77.

72. Yang, X. Microbial protein production from CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, and recycled nitrogen: Focusing on ammonia toxicity and nitrogen sources / X. Yang, M. Xu, R. Zou, I. Angelidaki, Y. Zhang // J Clean Prod. – 2021. – Vol. 291. – №125921.

73. Савельева, Н. Д. К систематике водородных бактерий / Н. Д. Савельева, Т. Н. Жилина // Микробиология. – 1968. – Т. 309. – №1. – С. 223-226.

74. Пат. №2053292 Российская Федерация, МПК C12N 1/00, C12P 21/00. Штамм бактерий *Alcaligenes eutrophus* – продуцент белковой биомассы / Т. Г. Волова, Г. Н. Стасишина. – № 5024752/13 ; заявл. 08.01.92 ; опубл. 27.01.96 ; Бюл. № 1. – 6 с.

75. Ронжина, Н. О. Наноалмазы в биотехнологии: применение для выделения белков и создания индикаторных тест-систем / Н. О. Ронжина, К. А. Харина, А. П. Пузырь, В. С. Бондарь // Журнал Сибирского федерального университета. Биология 4. – 2010. – №3. – С. 418-433.

76. Шапхаев, Э. Г. Дезинтеграция клеток в биотехнологии: учебн. пособие / Э. Г. Шапхаев, В. Ж. Цыренов, И. Е Чебунина. – ВСГТУ. Улан-Удэ, 2005. – 94 с.
77. Исаенко, Е. Ю. Применение ультразвука для дезинтеграции микробных клеток / Е. Ю. Исаенко // *Annals of Mechnicov Institute*. – 2008. – №1. – С. 5-9.
78. Lowry, O. H. Protein measurement with Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall // *J Biol Chem*. – 1951. – V. 93. – №1. – P. 265-275.
79. Бузун, Г. А. Определение белка в растениях с помощью амидо-черного / Г. А. Бузун, К. М. Джемухадзе, Л. Ф. Милешко // *Физиол. растений*. – 1982. – Т. 29. – №1. – С. 198-203.
80. Duodu, K. Factors affecting sorghum protein digestibility / K. Duodu, J. R. N. Taylor, P. S. Belton, B. R. Hamaker // *J Cereal Sci*. – 2003. – V. 38. – P. 117–131.
81. Волова, Т. Г. Характеристика белков, синтезируемых водородокисляющими микроорганизмами / Т. Г. Волова, В. А. Барашков // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2010. – Т. 46. – №6. – С. 624–629.

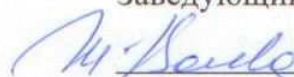
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
институт

Базовая кафедра биотехнологии  
кафедра

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 Т.Г. Волова

«22» июня 2021 г.

## МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Синтез основных и запасных внутриклеточных макромолекул бактериями

*Cupriavidus necator* В-10646

06.04.01 Биология

06.04.01.01 Микробиология и биотехнология

Научный руководитель

  
18.06.2021  
подпись, дата

Профессор, д.б.н.

Т. Г. Волова

должность, ученая степень

Выпускник

  
подпись, дата

Е. К. Егорова

Рецензент

  
подпись, дата

С.н.с., к.б.н.

А. Н. Бояндин

должность, ученая степень

Красноярск 2021